



09/403085

REC'D	08 JUN 1996
INPI	

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

20 AVR. 1996

PRIORITY DOCUMENT

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

#### SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cedex 08  
Telephone : 01 53 04 53 04  
Telecopie : 01 42 93 59 30

060704VP0

BLANK PAGE

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

INPI  
JOURNAL DE  
PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

10 rue de Saint Pétersbourg  
9300 Paris Cedex 08

téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>16 AVR. 1997</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>L7 97 04923 -</b> DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>L7</b> DATE DE DÉPÔT <b>16 AVR. 1997</b>		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE A QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  Cabinet GERMAIN & MAUREAU 12 rue Boileau 69006 LYON									
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°		n° du pouvoir permanent : <b>MD/B05B2628 FR</b> références du correspondant : <b>04/72/69/84/30</b>									
Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non											
Titre de l'invention (200 caractères maximum)  <b>COMPOSE LIGAND DE COORDINATION ET UTILISATION POUR FIXER UN MATERIEL BIOLOGIQUE</b>											
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN : <b>214 555 123 456 789</b> code APE-NAF : <b>7211Z</b> Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination <b>BIO MERIEUX</b>		Forme juridique <b>SA</b>									
Nationalité (s) <b>FRANÇAISE</b> Française											
Adresse (s) complète (s) <b>Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE</b>		Pays <b>FRANCE</b>									
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée											
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission											
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE <table border="1"> <thead> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° <b>1</b> date <b>16 AVR. 1997</b> n° <b>1</b>											
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription) <b>Mireille DIDIER</b>		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION <b>CHAPLAIN</b>									



# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

## DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

### DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75300 Paris Cédex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 04923

### TITRE DE L'INVENTION :

COMPOSE LIGAND DE COORDINATION ET UTILISATION POUR FIXER  
UN MATERIEL BIOLOGIQUE

### LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET GERMAIN & MAUREAU  
B.P. 6153  
69466 LYON CEDEX 06  
FRANCE

### DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

ELAISSARI Abdelhamid  
7 rue Jacques Monod  
69007 LYON

DURACHER David  
104 rue du Valmartin  
78860 ST NOM LA BRETECHE

PICHOT Christian  
5 Allée Roland Garros  
69960 CORBAS

MALLET François  
84 rue Anatole France  
69100 VILLEURBANNE

NOVELLI-ROUSSEAU Armelle  
29 rue du Parc  
38180 SEYSSINS

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

le 19 Février 1998

Dominique GUERRE  
CPI 921104

**Cabinet GERMAIN & MAUREAU**  
Conseils en Propriété Industrielle  
12, rue Boileau  
69006 LYON

La présente invention relève du domaine de la fixation d'un matériel biologique, contenu dans un échantillon, ledit matériel comprenant une partie susceptible d'interagir avec un métal de transition, en  
5 formant des liaisons de coordination.

Dans la présentation de l'invention qui suit, il est en particulier fait référence à la fixation d'un matériel biologique protéique, mais bien entendu, la portée de l'invention ne saurait s'y limiter.

10 Ainsi, par matériel biologique, on entend selon l'invention, notamment, un matériel protéique ou glycoprotéique tel qu'un antigène, un haptène, un anticorps, une protéine, un peptide, une enzyme, un substrat, et fragments de ceux-ci ; mais aussi un matériel  
15 nucléique tel qu'un acide nucléique (ADN ou ARN), un fragment d'acide nucléique, une sonde, une amorce ; une hormone ; à la condition que le matériel biologique comprenne une partie ou site d'interaction avec un métal de transition, en formant des liaisons de coordination.

20 Conformément à l'article de M. Kempe et al. (1), on connaît un procédé de capture d'une protéine présentant des séquences polyhistidines, à savoir la RNase A, selon lequel on utilise la forte affinité du groupement imidazole de l'histidine pour les métaux. Ce procédé  
25 consiste à disposer de particules de silice, fonctionnalisées par des groupes méthacrylates, d'une part, à mettre en contact la protéine et un agent complexant des métaux, à savoir, l'acide N-(4-vinyl)-benzyl-iminodiacétique (VBIDA), avec un métal, pour  
30 obtenir un complexe résultant de liaisons de coordination entre le métal et les groupes imidazole de l'histidine, et de liaisons de coordination entre le métal et les groupes carboxyliques de VBIDA, d'autre part, puis à mettre en contact lesdites particules de silice fonctionnalisées  
35 avec le complexe formé ci-dessus.

Selon la présente invention, on apporte un procédé de fixation de matériel biologique, permettant d'optimiser la complexation de ce matériel avec un complexe métallique, tout en diminuant, voire éliminant, toute réaction  
5 secondaire d'adsorption dudit matériel sur le complexe métallique.

A cette fin, le procédé de fixation d'un matériel biologique, de l'invention, utilise un composé ligand de coordination, ou un composé complexe obtenu à partir de ce  
10 dernier, ledit composé ligand présentant les caractéristiques suivantes :

il est sous forme microparticulaire ou sous forme linéaire,

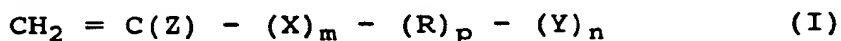
il est constitué par au moins un polymère  
15 particulaire ou linéaire, avec une surface apparente hydrophile, et des groupes complexants libres, fixés de manière covalente.

Le terme "microparticulaire" signifie selon l'invention sous forme de particules d'une taille au plus  
20 égale à 10  $\mu\text{m}$ . De préférence elles ont une taille ne dépassant pas 5  $\mu\text{m}$ .

Le polymère particulaire ou linéaire est avantageusement un polymère hydrophile, et notamment un polymère fonctionnalisé obtenu par polymérisation d'un  
25 premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide, d'un dérivé d'acrylamide, de méthacrylamide ou d'un dérivé de méthacrylamide, au moins un agent de réticulation et au moins un second monomère, fonctionnel.

Pour l'obtention de ce polymère avantageux, le  
30 premier monomère est de préférence choisi parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-n-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide,  
35 le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, le premier monomère étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM). Le

ou les seconds monomères fonctionnels appartiennent de préférence au groupe de ceux qui répondent à la formule (I) suivante :



5 dans laquelle :

Z représente H, un radical alkyle en C1-C5, le radical benzyle, -COOH, ou -CO-NH-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,

Y représente -CH<sub>2</sub>-COOH, -N(CH<sub>2</sub>-COOH)<sub>2</sub>,  
-N(CH-COOH)(CH<sub>2</sub>-COOH), ou -N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>,

10 (CH<sub>2</sub>-COOH)

X représente -NH(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), -N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)<sub>2</sub>,  
-N(CH<sub>2</sub>-COOH)(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), ou CH(COOH)-,

R représente une chaîne hydrocarbonée linéaire, éventuellement interrompue par au moins un hétéroatome,  
15 tel que O ou N,

m et p sont chacun un entier qui, indépendamment l'un de l'autre, équivalent à 0 ou 1, et  
n est un entier variant entre 1 et 3.

A titre d'exemple le second monomère est choisi parmi  
20 l'acide itaconique, les dérivés acryliques et les dérivés méthacryliques.

Comme dit précédemment, le composé ligand de l'invention peut se présenter sous forme microparticulaire ou sous forme linéaire.

25 Quand il est particulaire, ledit composé ligand peut ne consister qu'en ledit polymère particulaire, ou bien il peut posséder un noyau organique ou inorganique, hydrophile ou non hydrophile, revêtu dudit polymère particulaire et/ou dudit polymère linéaire.

30 Ledit noyau du ligand particulaire est avantageusement choisi dans le groupe comprenant le polystyrène, la silice et les oxydes métalliques. Il peut en outre comprendre un composé magnétique.

Pour des utilisations particulières, le composé  
35 ligand de l'invention peut être avantageusement marqué par un marqueur qui est, à titre d'exemple, choisi dans le

groupe consistant en une enzyme, la biotine, l'iminobiotine, un composant fluorescent, un composant radioactif, un composant chimioluminescent, un composant d'électrodensité, un composant magnétique, un antigène, un haptène et un anticorps.

Comme les exemples de la présente description l'illustreront, le polymère particulière préféré de l'invention est le poly-NIPAM (PNIPAM) comprenant des groupes complexants dérivés de l'acide itaconique ou de l'anhydride maléique-co-méthylvinyléther.

Un autre objet de l'invention est un composé complexe de coordination comprenant au moins un composé ligand tel que défini ci-dessus et un métal de transition. Ce dernier est de préférence choisi parmi le zinc, le nickel, le cuivre, le cobalt, le fer, le magnésium, le manganèse, le plomb, le palladium, le platine et l'or.

L'invention concerne également une composition liquide d'un composé ligand de coordination, comprenant une phase continue aqueuse et une phase discontinue, dispersée dans la phase continue et constituée d'au moins un composé ligand de l'invention, ainsi qu'une composition liquide d'un complexe de coordination, comprenant une phase continue aqueuse et une phase discontinue dispersée dans cette dernière et constituée d'au moins un composé complexe de l'invention.

L'invention apporte aussi un composé conjugué comprenant un composé complexe tel que défini précédemment et un premier matériel biologique fixé sur ledit composé complexe, par des liaisons de coordination entre le métal de transition du composé complexe et les sites d'affinité du premier matériel biologique. Avantageusement le premier matériel biologique est une protéine. A titre d'exemple c'est la protéine p24 ou gp160 du VIH, en vue de la détection dans le sérum d'un patient d'anticorps dirigés contre l'une ou l'autre de ces protéines. Cette protéine peut aussi être choisie parmi la protéine A, la protéine G



et l'hybride de la protéine A et de la protéine G, sur laquelle des anticorps pourront être fixés en vue de la détection, dans un échantillon, d'antigènes spécifiques desdits anticorps.

5 Les sites d'affinité du matériel biologique considéré dans la présente invention, pour les ions métalliques de transition, consistent avantageusement en des sites riches en acides aminés choisis parmi l'histidine, la cystéine, la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine. Ces sites  
10 peuvent exister naturellement dans le matériel biologique, quand il est protéique notamment. Ou bien ils peuvent être "importés" préalablement dans le matériel biologique, selon des techniques bien connues de l'homme du métier telles que celle employée pour la purification des  
15 protéines par le procédé IMAC (Immobilized Metal ion-Affinity Chromatography) sur des résines (2,3). A titre d'exemple, de tels sites peuvent être incorporés dans un matériel biologique protéique et notamment une protéine, par génie génétique pour obtenir des protéines  
20 recombinantes.

Les sites peuvent se présenter sous la forme de suites desdits acides aminés identiques ou différents, contigus ou non, mais voisins. Lorsqu'ils sont "importés" dans le matériel biologique, on préférera les sites qui  
25 consistent en des suites de 6 résidus histidine et/ou cystéine contigus.

D'autres objets de l'invention consistent en un support particulaire ou non particulaire, recouvert au moins partiellement par un composé ligand de l'invention,  
30 un support particulaire ou non particulaire, recouvert au moins partiellement par un composé complexe de l'invention, et un support particulaire ou non particulaire, recouvert au moins partiellement par un composé conjugué de l'invention.

35 La présente invention concerne aussi les applications d'un composé ligand, d'un composé complexe et d'un composé

conjugué, répondant aux définitions ci-dessus, pour fixer un premier matériel biologique présentant des sites d'affinité pour un métal, et contenu dans un échantillon, et éventuellement un second matériel biologique susceptible de réagir avec le premier matériel biologique.

Par second matériel biologique susceptible de réagir avec le premier matériel biologique, on comprend un premier et un second matériels biologiques tels que définis précédemment, dont l'interaction est celle d'un ligand avec un anti-ligand, du type de celle intervenant entre un antigène et un anticorps, un anticorps et un haptène, une hormone et un récepteur, une protéine et un anticorps, la biotine et la streptavidine, une lectine et un sucre, deux oligonucléotides, un oligonucléotide et un acide nucléique, une enzyme et un substrat.

Selon une première utilisation d'un composé ligand de l'invention, un procédé de fixation d'un premier matériel biologique comprend les étapes consistant à :

- a) à disposer d'un composé ligand décrit ci-dessus,
- b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit composé ligand en présence d'au moins un métal de transition,
- c) après avoir éventuellement observé la formation d'un composé conjugué entre le composé ligand, le métal de transition et le premier matériel biologique, à séparer ledit composé conjugué.

Selon une première utilisation d'un composé complexe de l'invention, un procédé de fixation d'un premier matériel biologique comprend les étapes consistant à :

- a) à disposer d'un composé complexe défini ci-dessus,
- b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit composé complexe,
- c) après avoir éventuellement observé la formation d'un composé conjugué entre le composé complexe

et le premier matériel biologique, à séparer ledit composé conjugué.

Avantageusement, l'étape (b) des procédés décrits ci-dessus est effectuée à un pH supérieur ou égal au point  
5 isoélectrique du premier matériel biologique à fixer, afin de réduire ou supprimer l'adsorption du matériel sur le composé complexe.

Le composé ligand, le composé complexe ou le composé conjugué peut aussi être utilisé dans un procédé de  
10 fixation d'un second matériel biologique contenu dans un échantillon et susceptible d'interagir avec ledit premier matériel biologique. Ce procédé comprend les étapes consistant :

a) à disposer d'un composé conjugué de  
15 l'invention, tel qu'obtenu à partir d'un composé ligand de l'invention en présence d'un métal de transition et du premier matériel biologique, ou à partir d'un composé complexe en présence du premier matériel biologique,

b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit  
20 composé conjugué,

c) après avoir éventuellement observé l'interaction entre le premier et le second matériels biologiques, à séparer ledit composé conjugué portant le second matériel biologique.

25 Une variante du procédé qui vient d'être décrit est un procédé qui comprend les étapes consistant :

a) à disposer d'un support de l'invention, particulière ou non particulière recouvert au moins partiellement par un composé conjugué, tel qu'obtenu par  
30 exemple, à partir d'un support recouvert d'un composé ligand de l'invention, d'un métal de transition et du premier matériel biologique, ou à partir d'un support recouvert d'un composé complexe de l'invention et du premier matériel biologique,

35 b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit support,

c) après avoir éventuellement observé l'interaction entre le premier et le second matériels biologique, à séparer ledit support portant le second matériel biologique.

5 Le procédé de fixation d'un second matériel biologique dont deux variantes viennent d'être décrites peut comprendre en outre une étape (d) consistant à mettre en contact ledit conjugué portant le second matériel biologique, ou ledit support portant le second matériel  
10 biologique, obtenu selon (c), soit avec un composé ligand marqué et un métal de transition, soit avec un composé complexe marqué.

Avant d'exposer plus en détail l'invention dans les exemples, certains termes employés dans la présente  
15 description et dans les revendications sont ci-après définis :

Par fixation d'un matériel biologique selon l'invention, on comprend la séparation, l'isolement, la détection et/ou quantification de ce matériel,  
20 l'enrichissement d'une fraction en matériel biologique, selon une méthode de fixation spécifique ou aspécifique, de manière qualitative et/ou quantitative.

Un échantillon tel qu'on l'entend selon l'invention, comprend tout échantillon susceptible de contenir un  
25 matériel biologique, notamment un échantillon tel que celui obtenu à partir d'un fluide biologique, un échantillon d'origine alimentaire, ou une culture cellulaire.

L'échantillon consiste en tout ou partie d'un autre  
30 échantillon, en particulier il peut consister en un aliquote, une dilution.

La complexation telle qu'entendue selon la présente invention est définie par la formation d'un complexe de coordination entre un métal de transition et un composé  
35 ligand, le métal de transition appartenant lui-même déjà à un complexe de coordination ou non.

Enfin par polymère fonctionnalisé, on entend un polymère présentant au moins une interface portant des groupes fonctionnels susceptibles de se fixer par covalence avec des groupes dits complexants.

5 Par groupe complexant, on comprend tout groupe susceptible d'interagir avec au moins un métal de transition pour former des liaisons de coordination avec celui-ci. A titre d'illustration, le document EP-A-0 570 022 décrit un bon nombre de groupes complexants  
10 qui conviennent dans le cadre de la présente invention.

Un polymère thermosensible est caractérisé par un paramètre physico-chimique qui est sa température critique inférieure de solubilité (LCST) (4), au-delà ou en-deçà de laquelle, la conformation du polymère en solution change,  
15 ainsi que ses propriétés physico-chimiques. Le poly-(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) en est un exemple. Il possède une LCST de 32°C, température en-dessous de laquelle les chaînes de PNIPAM sont gonflées d'eau, donc hydratées et hydrophiles. Au-dessus de cette température,  
20 on observe le phénomène inverse, les chaînes de PNIPAM se rétractent en expulsant l'eau et deviennent hydrophobes.

Les caractéristiques et avantages de la présente invention sont ci-après illustrés par les Exemples 1 à 5 et les Figures 1 à 3 selon lesquelles:

25 Figure 1 représente un isotherme de couplage du polymère AMVE sur des particules de polymère particulaire poly-(St-NIPAM-AEM).

Figure 2 représente la variation de la quantité de protéine RH24 adsorbée sur un polymère particulaire poly-  
30 (St-NIPAM-AMVE) en fonction du pH et de la salinité du milieu.

Figure 3 représente la quantité de protéine RH24 complexée sur un polymère particulaire poly-(St-NIPAM-AMVE) en fonction du pH et de la salinité du milieu et  
35 pour une concentration en ions  $Zn^{2+}$  de l'ordre de 0,3 M.

**EXEMPLE 1: Réactifs employés****Monomère :**

- Styrène à 99 % (Janssen Chemica, ref13 279-87),  
Mw=104,5 g.mol<sup>-1</sup>

5 Il est utilisé après purification par distillation sous vide.

- N-isopropylacrylamide (NIPAM) (Kodak ref 10 982),  
Mw=113,16 g.mol<sup>-1</sup>

10 Il est recristallisé avant son utilisation, comme suit. Il est dissous dans un mélange hexane/toluène (60/40, v/v).

**Monomère fonctionnel :**

- Chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate (AEM) (Kodak ref 18513), Mw=165,62 g.mol<sup>-1</sup>

Il est utilisé sans recristallisation.

15 **Agent de réticulation :**

- N,N-méthylène bisacrylamide (MBA) (Amilabo ref 10897),  
Mw=271.19 g.mol<sup>-1</sup>

Il est utilisé sans recristallisation.

**Amorceur :**

20 - Hydrochlorure de 2,2'azobis (2-amidino propane) (V50) (Wako trade name), Mw = 271,19 g.mol<sup>-1</sup>

Le V50 est recristallisé avant son utilisation, comme suit. L'amorceur est dissous dans un mélange 60/40 d'eau et d'acétone. La solution est filtrée sous vide avec un  
25 rendement de 30%.

- Persulfate de potassium (Prolabo), Mw = 270,32 g.mol<sup>-1</sup>

Il est utilisé sans recristallisation.

**Groupes complexants :**

- Acide itaconique (Aldrich), Mw = 132 g.mol<sup>-1</sup>

30 Il est utilisé sans recristallisation.

- Anhydride maléique-co-méthylvinyléther (AMVE)  
(Polysciences)

Il est utilisé sans recristallisation.

**EXEMPLE 2: Synthèse du ligand PNIPAM-acide itaconique**

Dans un réacteur thermostaté de 250 ml, sont versés 4,38 g de N-isoprpylacrylamide, 200 g d'eau, 0,37 g de MBA, 0,5 g d'acide itaconique et 0,45 g d'acrylamide. Le  
5 mélange est maintenu sous agitation à 300 tours par minute sous atmosphère d'azote et à une température de 70°C. Le persulfate de potassium (0,05 g), amorceur hydrosoluble, est introduit (en solution dans 5 g d'eau) dans la solution au dernier moment pour démarrer la réaction de  
10 polymérisation.

La polymérisation est poursuivie pendant 5 heures dans les mêmes conditions.

Le taux de conversion de la polymérisation est évalué à 98%.

15 Le ligand obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- le diamètre des particules, mesuré par diffusion dynamique de la lumière, est de 1500 nm,
- le dosage des fonctions superficielles, suivi  
20 par conductimétrie, a donné 0,3 mmole/g de latex de groupements acide faible (-COOH).

**EXEMPLE 3: Modification des particules hydrophiles aminées par greffage du polymère linéaire complexant poly-AMVE****25 1) Synthèse du polymère particulaire poly-(styrène-NIPAM)****a) Préparation du polymère particulaire hydrophile**

Selon cet exemple la préparation consiste :

dans un premier temps, à synthétiser un polymère poly-(St-NIPAM) contenant les monomères de base, à savoir  
30 le styrène et le NIPAM, selon une polymérisation en réacteur fermé, avec 200 g d'eau, 18 g de styrène, 2 g de NIPAM et 0,2 g de V50, puis

dans un deuxième temps, à ajouter, à un degré de conversion donné, le monomère fonctionnel (AEM), seul ou  
35 en présence des réactifs de base, à savoir 5 g de NIPAM, 0

à 4 % de AEM (par rapport au NIPAM), 0,122 g de V50 et 0,069 g de BA.

5 Cette technique permet d'optimiser l'incorporation en surface d'un monomère fonctionnel. Les conditions de synthèse sont les mêmes que celles de la polymérisation en réacteur fermé, c'est-à-dire température et agitation constante.

b) Caractéristiques du polymère particulaire obtenu

10 Les résultats sur la structure du polymère obtenu, sa taille et sa polydispersité, sont regroupés dans le tableau 1 suivant.



Tableau 1

Désignation du polymère	AEM %	D(nm) 20°C (a)	D(nm) 50°C (a)	chevelure (nm) (b)	D(nm) MET (c)	Ip (c)
DD10	0	603	364	119	288	1.012
DD15	1	421	327	47	333	1.008
DD12	3	484	334	75	302	1.004
DD11	4	358	315	21	303	1.005

(a) : Diamètre déterminé par diffusion dynamique de la lumière à 20°C et à 50°C

(b) : La chevelure correspond à l'épaisseur de PNIPAM à la surface des particules

(c) : Diamètre et indice de polydispersité obtenu par microscopie électronique.

Les taux de fonctionnalisation des polymères obtenus exprimés par les résultats du dosage des fonctions amines présentes à la surface des polymères, sont mentionnés dans le tableau 2 suivant.

Tableau 2

Désignation du polymère	AEM (%) introduit	SPDP <sup>*</sup> mmol.m <sup>-2</sup>
DD10	0	0.75
DD15	1	1.44
DD12	3	2.99
DD11	4	2.76

\* : densité de charge calculée en utilisant la taille à 20°C déterminée par diffusion dynamique de la lumière.

## 2) Greffage du poly-AMVE sur les particules aminées

Le ligand est obtenu par fixation de façon covalente sur les polymères obtenus selon 1) de groupes complexants, consistant, selon le présent exemple, en des groupes  
5 dérivés de l'AMVE (anhydride maléique-co-méthylvinyléther), qui est un polymère linéaire.

L'utilisation de l'AMVE présente deux avantages : d'une part, il permet, grâce à ses fonctions anhydrides très réactives, un couplage facile avec les amines  
10 présentes à la surface du polymère particulaire, et, d'autre part, une fois le couplage réalisé, il expose de nombreuses fonctions dicarboxyliques complexantes, qui interagiront avec un métal de transition (Zn, Ni, Cu, Co,...).

15 L'AMVE est utilisé en solution dans le DMSO anhydre afin d'éviter l'hydrolyse des fonctions anhydrides par lesquelles la réaction de couplage sur les fonctions amines des polymères particulaires est possible. La réaction de couplage doit être conduite dans un milieu  
20 basique afin d'éviter la protonation des fonctions amines des polymères. Le tampon utilisé est un tampon borate de pH 8,2 et de force ionique  $10^{-2}$  M. Le milieu de couplage ne doit pas excéder 10 % en volume de DMSO.

Les résultats qui apparaissent à la Figure 1 montrent  
25 une bonne corrélation entre les deux méthodes d'analyse. La pente initiale de l'isotherme de couplage montre que la réaction est totale pour des faibles quantités d'AMVE introduites. La valeur du plateau est de  $2,75 \text{ mg.m}^{-2}$  et est atteinte très rapidement pour des faibles  
30 concentration en AMVE.

### EXEMPLE 4 : Complexation d'un métal de transition avec un ligand de l'invention

L'introduction d'un métal de transition dans une  
35 solution du ligand obtenu selon l'Exemple 2 ou 3 doit permettre la fixation du métal par complexation sur les

particules. Cette complexation s'effectue par le biais des atomes d'oxygène des fonctions anhydrides. La présence de doublets libres sur les atomes d'oxygène permet de former des liaisons de coordination avec le métal de transition.

5 Le métal utilisé ( $Zn^{2+}$ ) est introduit dans une solution du polymère afin d'obtenir une concentration en ion métallique en solution de  $10^{-4}$  M. L'excès de cation métallique qui se trouve en solution est éliminé par des centrifugations successives.

10

**EXEMPLE 5 : Complexation de la protéine RH24 selon un procédé de l'invention**

La protéine étudiée dans le cadre de cet exemple est la protéine recombinante modifiée (appelé RH24) en N-  
15 terminal par un "Tag" histidine (séquence de six résidus histidine contigus) (5). Cette protéine a une masse de  $27.10^3$  g.mol<sup>-1</sup> et un point isoélectrique de 6,1. Cette modification a été mise à profit pour réaliser la complexation de la protéine sur un support particulaire,  
20 conformément au procédé de l'invention.

Afin de pouvoir déterminer la concentration de protéine complexée sur le latex, des études d'adsorption de la protéine ont été menées en parallèle.

Comme l'état de la technique le montre, ce sont les  
25 interactions électrostatiques qui gouvernent l'adsorption des protéines sur un polymère hydrophile (6). On a donc étudié l'effet de la force ionique et du pH sur la quantité de protéines adsorbées, afin de déterminer les conditions pour lesquelles l'adsorption est négligeable,  
30 voire nulle.

La figure 2 montre l'adsorption de la protéine RH24 sur le ligand obtenu selon l'Exemple 3, poly-(St-NIPAM-AMVE).

Selon la figure 2, on observe que le taux  
35 d'adsorption de la RH24 est fortement dépendant du pH.

Une étude similaire a été effectuée pour la complexation en faisant varier les mêmes paramètres. La figure 3 montre les résultats de la complexation en fonction du pH, pour différentes forces ioniques et pour  
5 des concentrations constantes en ion complexant ( $Zn^{2+}$ ).

Comme il est observé sur cette figure, la complexation de la protéine sur le ligand poly-(St-NIPAM-AMVE) en présence de zinc est peu dépendante du pH excepté pour les faibles forces ioniques.

10 Ces résultats permettent de déterminer des conditions optimales de complexation au détriment de l'adsorption. Ainsi un pH supérieur ou égal à 7 permet d'avoir une adsorption quasi nulle tout en ayant une complexation proche de  $1,5 \text{ mg.m}^{-2}$ . Quant à la force ionique il faut  
15 qu'elle soit minimale pour favoriser la complexation.

## BIBLIOGRAPHIE

- 5 (1) Kempe M., Glad M. & Mosbach K., *Journal of molecular recognition*, 8, 35 (1995)
- (2) Porath J., Carlsson., Olsson., Belfrage J., *Nature*, 258, 598 (1975)
- (3) Porath J., *Trends Anal. Chem.*, 7, 254 (1988)
- 10 (4) Hiroshi Inomata et al., *Macromolecules*, 27, 6459-6464 (1994)
- (5) Cheynet V., Verrier B., Mallet F., *proteine expression and purification*, 4, 367 (1993)
- (6) Suzawa T., Shirahama H., *Advanced in Colloid and Interface Science*, 35, 139 (1991).
- 15

## REVENDICATIONS

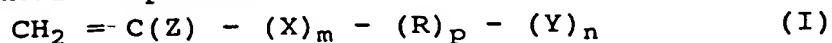
1. Composé ligand de coordination, sous forme microparticulaire ou linéaire, constitué par au moins un polymère particulaire ou linéaire, avec une surface apparente hydrophile, et des groupes complexants libres.

2. Composé ligand selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit polymère est choisi dans le groupe des polymères hydrophiles.

3. Composé ligand selon la revendication 2, caractérisé en ce que le polymère est un polymère fonctionnalisé obtenu par polymérisation d'un premier monomère hydrosoluble, d'acrylamide, d'un dérivé d'acrylamide, de méthacrylamide ou d'un dérivé de méthacrylamide, d'au moins un agent de réticulation et d'au moins un second monomère, fonctionnel.

4. Composé ligand selon la revendication 3, caractérisé en ce que le premier monomère est choisi parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-n-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, le premier monomère étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM).

5. Composé ligand selon la revendication 3, caractérisé en ce que le ou les seconds monomères fonctionnels répondent à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

Z représente H, un radical alkyle en C1-C5, le radical benzyle, -COOH, ou -CO-NH-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,

Y représente -CH<sub>2</sub>-COOH, -N(CH<sub>2</sub>-COOH)<sub>2</sub>,  
-N(CH-COOH)(CH<sub>2</sub>-COOH), ou -N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>,  
(CH<sub>2</sub>-COOH)

X représente -NH(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), -N(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)<sub>2</sub>,  
-N(CH<sub>2</sub>-COOH)(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), ou CH(COOH)-,

R représente une chaîne hydrocarbonée linéaire, éventuellement interrompue par au moins un hétéroatome, tel que O ou N,

m et p sont chacun un entier qui, indépendamment l'un de l'autre, équivalent à 0 ou 1, et  
5 n est un entier variant entre 1 et 3.

6. Composé ligand selon la revendication 5, caractérisé en ce que le second monomère est choisi parmi l'acide itaconique, les dérivés acryliques et les dérivés  
10 méthacryliques.

7. Composé ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est sous forme microparticulaire et en ce que la taille moyenne des particules est au plus égale à 5  $\mu\text{m}$ .

15 8. Composé ligand selon la revendication 7, caractérisé en ce que chaque particule comprend en outre un noyau organique ou inorganique, hydrophile ou non hydrophile.

9. Composé ligand selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit noyau est choisi dans le groupe comprenant le polystyrène, la silice et les oxydes  
20 métalliques.

10. Composé ligand selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que ledit noyau renferme en outre un  
25 composé magnétique.

11. Composé ligand selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que ledit noyau est revêtu dudit polymère, ledit polymère étant linéaire.

12. Composé ligand selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que ledit noyau est revêtu dudit polymère, ledit polymère étant  
30 particulaire.

13. Composé ligand selon la revendication 7, caractérisé en ce que lesdites particules consistent en un  
35 polymère particulaire, hydrophile avec des groupes complexants libres.

14. Composé ligand selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit polymère est le PNIPAM et les groupes complexants sont dérivés de l'acide itaconique ou de l'anhydride maléique-co-méthylvinyléther.

5        15. Composé ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est sous forme linéaire.

10        16. Composé ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un marqueur.

15        17. Composé ligand selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit marqueur est choisi parmi le groupe consistant en une enzyme, la biotine, l'iminobiotine, un composant fluorescent, un composant radioactif, un composant chimioluminescent, un composant d'électrodensité, un composant magnétique, un antigène, un haptène et un anticorps.

20        18. Composé complexe de coordination comprenant au moins un composé ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, et éventuellement 16, et un métal de transition.

19. Composé complexe de coordination comprenant au moins un composé ligand selon la revendication 15, et éventuellement 16, et un métal de transition.

25        20. Composé complexe selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce que le métal de transition est choisi parmi le zinc, le nickel, le cuivre, le cobalt, le fer, le magnésium, le manganèse, le plomb, le palladium, le platine et l'or.

30        21. Composition liquide d'un ligand de coordination, comprenant une phase continue aqueuse et une phase discontinue, dispersée dans la phase continue et constituée d'au moins un composé ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.

35        22. Composition liquide d'un complexe de coordination, comprenant une phase continue aqueuse et une



phase discontinue dispersée dans la phase continue et constituée d'au moins un composé complexe selon l'une quelconque des revendications 18 à 20.

23. Composé conjugué comprenant un composé complexe  
5 selon l'une quelconque des revendications 18 à 20 et un premier matériel biologique fixé sur ledit composé complexe.

24. Composé conjugué selon la revendication 23,  
10 caractérisé en ce que le premier matériel biologique est une protéine.

25. Composé conjugué selon la revendication 23,  
caractérisé en ce que le premier matériel biologique est la protéine A, la protéine G ou un hybride de la protéine A et de la protéine G.

15 26. Support non particulaire recouvert au moins partiellement par un composé ligand selon l'une quelconque des revendications 7 à 16.

27. Support particulaire recouvert au moins partiellement par un composé ligand selon l'une quelconque  
20 des revendications 7 à 16.

28. Support non particulaire recouvert au moins partiellement par un composé complexe selon l'une quelconque des revendications 18 à 20.

29. Support particulaire recouvert au moins  
25 partiellement par le composé complexe selon l'une quelconque des revendications 18 à 20.

30. Support non particulaire recouvert au moins partiellement par un composé conjugué selon l'une quelconque des revendications 23 à 25.

30 31. Support particulaire recouvert au moins partiellement par un composé conjugué selon l'une quelconque des revendications 23 à 25.

32. Procédé de fixation d'un premier matériel biologique comprenant une partie susceptible de réagir  
35 avec un métal de transition, et contenu dans un

échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant :

a) à disposer d'un composé ligand selon l'une quelconque des revendications 1 à 17,

5 b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit composé ligand en présence d'au moins un métal de transition,

c) après avoir éventuellement observé la formation d'un composé conjugué entre le composé ligand, 10 le métal de transition et le premier matériel biologique, à séparer ledit composé conjugué.

33. Procédé de fixation d'un premier matériel biologique comprenant une partie susceptible de réagir avec un métal de transition, et contenu dans un 15 échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant :

a) à disposer d'un composé complexe selon l'une quelconque des revendications 18 à 20,

b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit 20 composé complexe,

c) après avoir éventuellement observé la formation d'un composé conjugué entre le composé complexe et le premier matériel biologique, à séparer ledit composé conjugué.

25 34. Procédé de fixation d'un second matériel biologique contenu dans un échantillon et susceptible d'interagir avec un premier matériel biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant :

a) à disposer d'un composé conjugué selon l'une 30 quelconque des revendications 23 à 25,

b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit composé conjugué,

c) après avoir éventuellement observé l'interaction entre le premier et le second matériels 35 biologiques, à séparer ledit composé conjugué portant le second matériel biologique.

35. Procédé de fixation d'un second matériel biologique contenu dans un échantillon et susceptible d'interagir avec un premier matériel biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant :

5           a) à disposer d'un support selon la revendication 30 ou 31,

          b) à mettre en contact l'échantillon avec ledit support,

          c) après avoir éventuellement observé  
10 l'interaction entre le premier et le second matériels biologiques, à séparer ledit support.

36. Procédé selon la revendication 34 ou 35, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape (d) consistant à mettre en contact ledit conjugué portant le  
15 second matériel biologique, ou ledit support portant le second matériel biologique, obtenu selon (c), avec un composé ligand selon la revendication 16 ou 17 et un métal de transition.

37. Procédé selon la revendication 34 ou 35, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape (d) consistant à mettre en contact ledit conjugué portant le  
20 second matériel biologique, ou ledit support portant le second matériel biologique, obtenu selon (c), avec un composé complexe marqué selon la revendication 18 ou 19.

25       38. Procédé selon la revendication 32 ou 33, caractérisé en ce que l'étape (b) est effectuée à un pH supérieur ou égal au point isoélectrique du premier matériel biologique.

39. Procédé selon l'une quelconque des revendications  
30 32 à 38, caractérisé en ce que le premier matériel biologique est riche en histidine et/ou en cystéine.

40. Procédé selon l'une quelconque des revendications 34 à 38, caractérisé en ce que le second matériel biologique est riche en histidine et/ou en cystéine.

41. Procédé selon l'une quelconque des revendications 39 ou 40, caractérisé en ce que le premier et éventuellement le second matériels biologiques sont des matériels protéiques.

FIG 1

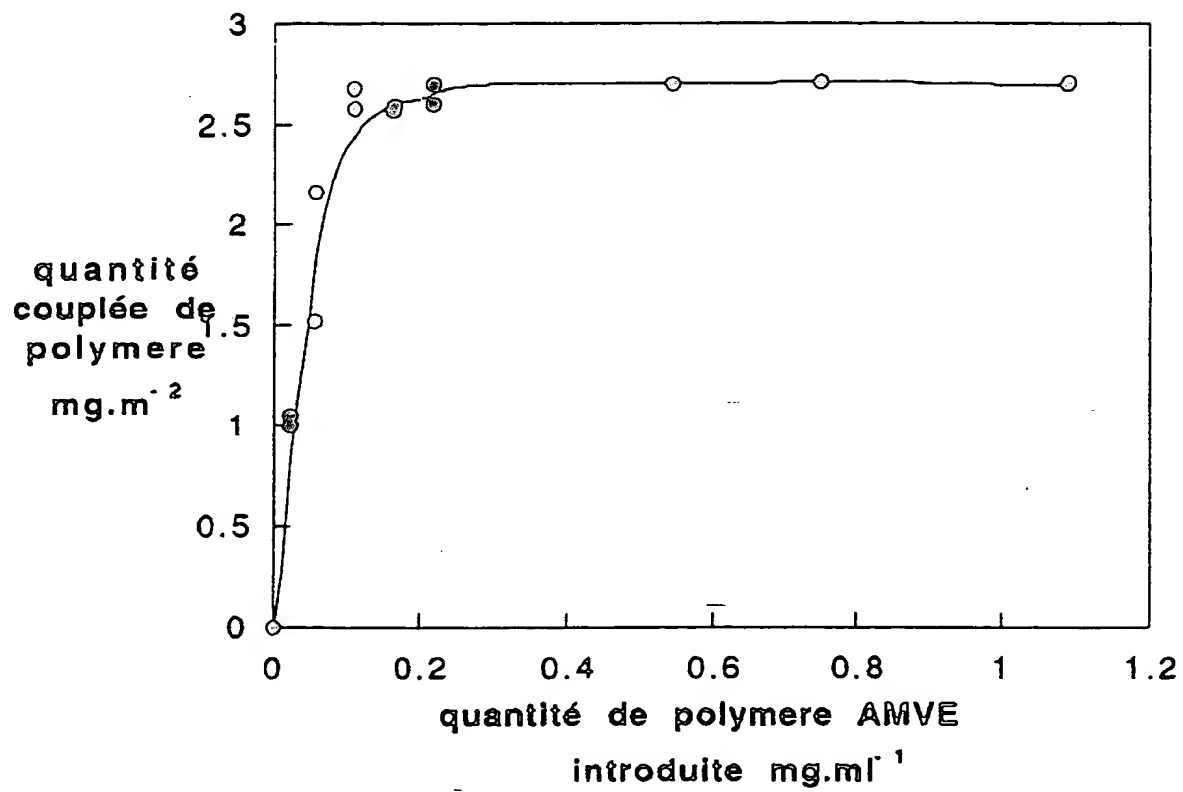


FIG 2

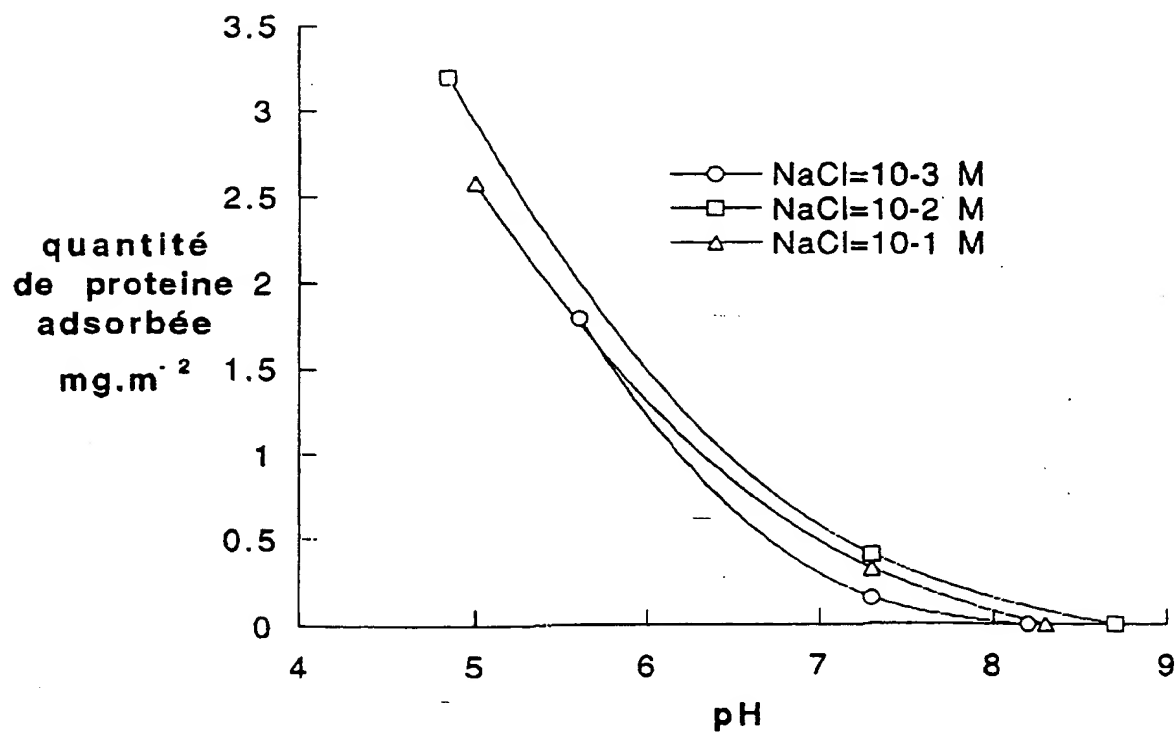
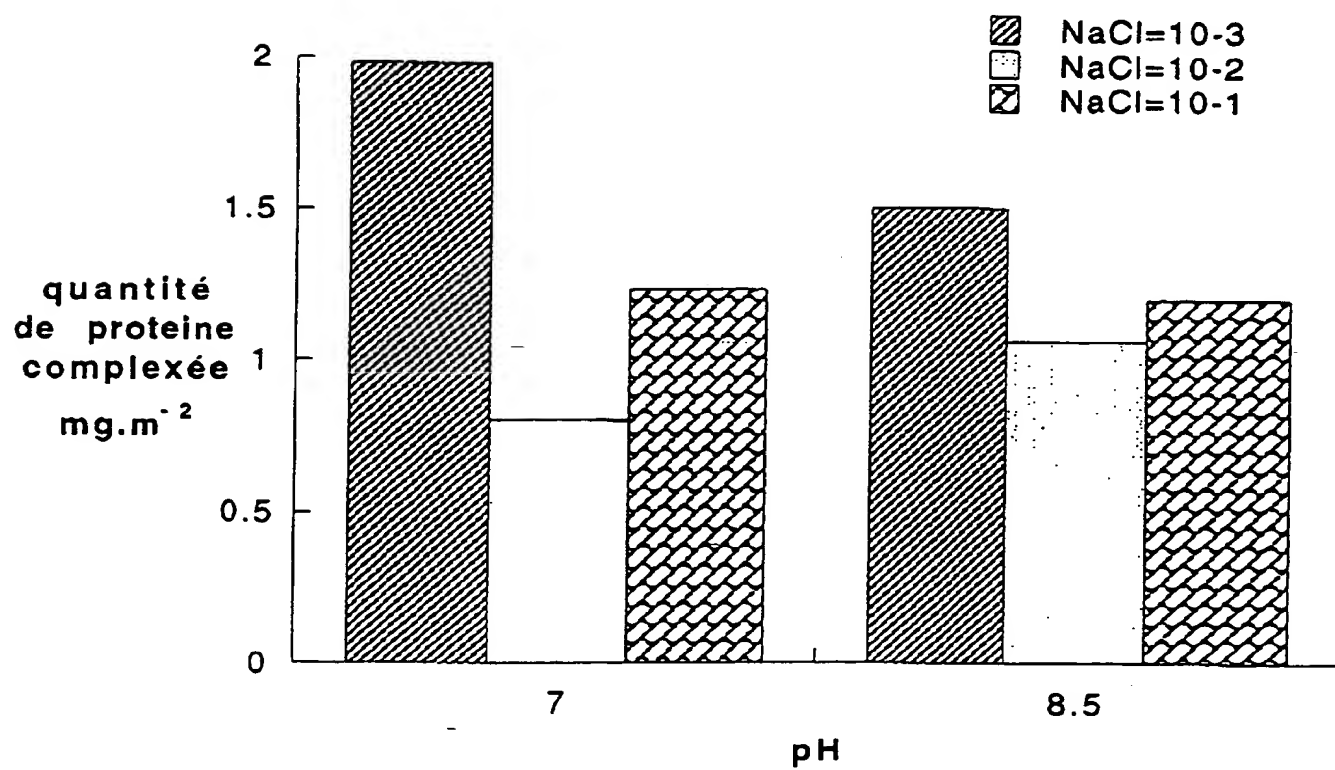


FIG 3



BLANK PAGE